

クロレラのルビジウム吸収に対する光の影響

蜂谷 欽司*・森次 益三**・河崎 利夫***

Effect of Light Irradiation on the Absorption of Rubidium in *Chlorella*

Kinji HACHIYA, Masumi MORITSUGU and Toshio KAWASAKI

The effect of light irradiation on the absorption of rubidium was examined in *Chlorella*. Rubidium absorption in *Chlorella* was clearly stimulated by the irradiation of light.

To clarify the mechanism of light-stimulation on rubidium absorption, experiments were carried out using several metabolic inhibitors; DCMU, NaCN, DNP, CCCP and ouabain. Among the metabolic inhibitors used, DCMU had the most similar effects on the rubidium absorption and oxygen evolution under light condition. These findings suggest a close correlation between the light-stimulation on rubidium absorption and the photosynthetic process in *Chlorella*.

Key words: *Chlorella*, Light-stimulation, Metabolic inhibitors,
Oxygen evolution, Rubidium absorption

緒 言

通常、高等植物は無機イオンや水を根から吸収し、地上部で光合成を行って成長する。しかし、たとえば海藻では、根に相当する部分（仮根）は位置を固定するための付着器官として働いており、養分の吸収は仮根以外の部位で行われる。高等植物についても、葉面施肥に関して多くの試験が実施され、また、クロロプラスト^{9,10)}や葉組織^{11,12)}による無機イオン吸収に対する光の関与についても研究が行われた。

単細胞の緑藻クロレラは光合成の研究材料として古くから用いられてきたが、近年、イオン輸送の実験にも使われるようになった¹⁻⁵⁾。本報告では、植物細胞の陽イオン吸収に対する

Research Institute for Bioresources, Okayama University, Kurashiki 710, Japan
平成7年1月10日受理 (Received January 10, 1995)

*現 岡山大学 RI 共同利用津島施設, **現 香川大学農学部, ***岡山大学名誉教授

光の影響を究明するため、クロレラを用いて、カリウムと化学的性質のよく似たルビジウムの吸収を放射性同位元素トレーサー法によって検討した。また、各種代謝阻害剤を用いて、ルビジウム吸収と光の影響、特に光合成過程との関連を追究した。

本報文について、柴坂三根夫博士(岡山大学資源生物科学研究所)から貴重な御批判と御意見を頂いた。ここに深謝の意を表する。

材料および方法

実験材料：*Chlorella ellipsoidea* (東京大学応用微生物研究所 Strain C-102) を用いた。

クロレラの培養：滅菌した培養液50 ml に乾物相当で約3 mg のクロレラを接種し、25°C の恒温室内で5%のCO₂を含む空気を通気しつつ5日間培養した。照明には白色蛍光管を用い、培養管表面の照度を約9000 lux とした。培養液の組成を表1に示す。培養したクロレラを2800 xg で5分間遠心分離して収穫した。

Table 1. Composition of culture medium

KNO ₃	: 30 mM
KH ₂ PO ₄	: 2 mM
Na ₂ HPO ₄	: 1 mM
MgSO ₄	: 2 mM
Fe (as Fe-EDTA)	: 1.0 ppm
Ca (as CaCl ₂)	: 0.2 ppm
Zn (as ZnSO ₄)	: 0.1 ppm
Mn (as MnCl ₂)	: 0.1 ppm
Cu (as CuSO ₄)	: 0.02 ppm
Mo (as (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄)	: 0.01 ppm

ルビジウム吸収実験の方法：収穫したクロレラを培養液に懸濁し、懸濁液をワールブルグ反応容器に入れ、放射性ルビジウム (⁸⁶Rb) で標識した塩化ルビジウムを加え、25±0.1°C の照光恒温水槽中で、明暗両処理条件下で一定時間振盪して吸収実験を行った。吸収溶液の最終液量は4 ml であり、塩化ルビジウムの最終濃度は1 mM とした。

明処理の光源としては白熱電球 (150 W のコールドミラー付ハイビーム球) を用い、反応容器の表面で約10000 lux の照度とした。暗処理では、反応容器をアルミ箔で包んで遮光した。本実験に用いた光源のスペクトル分布を Spectroradiometer (Instrumentation Specialities Co., Model SR) で測定した結果を図1に示す。

吸収実験の後、メンブラン・フィルター (Millipore Co., RAWP 02500) を用いてクロレラを吸収溶液から分離、非放射性的培養液で洗浄し、乾燥後、放射能強度を測定してルビジウム吸収量を算出した。

溶存酸素濃度の測定：クロレラの酸素発生ならびに酸素吸収を知るため、隔膜型ガルバニ

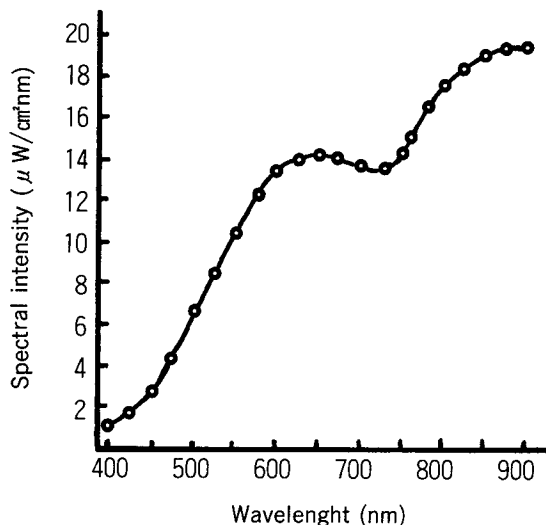


Fig. 1. Spectral distribution curve of light source.

電極方式の溶存酸素測定装置によって酸素濃度を測定した。光照射の場合に用いた光源はルビジウム吸収実験の場合と同じであり、反応容器の表面で約10000 lux の照度とした。

結 果

1. クロレラのルビジウム吸収に対する光の影響

明暗両条件下でクロレラによるルビジウム吸収を測定した結果を図-2に示す。この結果から、明暗両処理とも、時間の経過とともにルビジウムの吸収量は増加するが、明処理条件での吸収量は暗処理条件での吸収量に比べ明らかに大きく、光によるルビジウム吸収の促進効果が認められた。明暗両条件の間の差は吸収時間が10分ですでに明確であった。

2. クロレラのルビジウム吸収と酸素収支に対する各種代謝阻害剤の影響

クロレラのルビジウム吸収に対する光促進効果の機作を究明するため、ルビジウム吸収に対する各種代謝阻害剤の影響について検討した。また、クロレラの酸素発生や酸素吸収に対するそれら代謝阻害剤の影響についても検討し、ルビジウム吸収の光促進効果と光合成や呼吸との関連を追究することを試みた。使用した代謝阻害剤はDCMU (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea), NaCN (Sodium cyanide), DNP (2,4-dinitrophenol), CCCP (carbonylcyanide-m-chlorophenylhydrazone) および Ouabain (g-Strophanthin) であった。それら阻害剤の使用濃度はそれぞれの実験結果の中に記載する。ルビジウム吸収の実験時間は2時間であり、代謝阻害剤の添加は実験開始の20分前とした。

(1) DCMU

明暗両条件でのルビジウム吸収に対する DCMU 添加濃度の影響について検討した結果を図-3に示す。暗条件でのルビジウム吸収はDCMUの濃度上昇によって僅かしか影響され

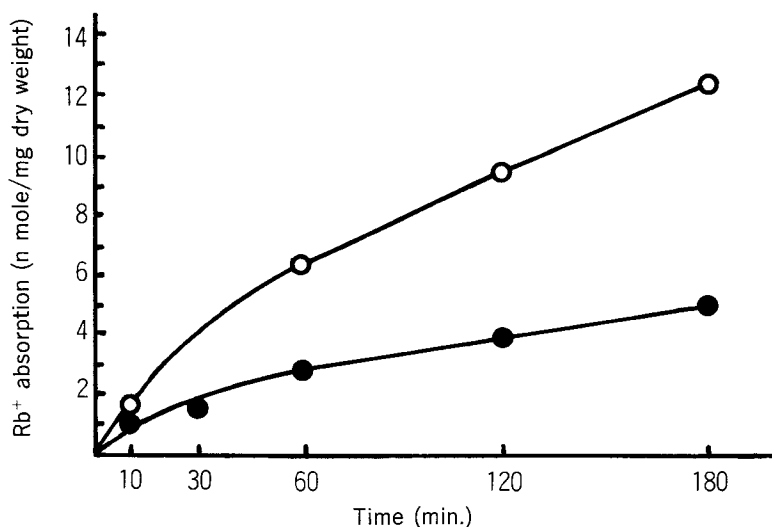


Fig. 2. Time courses of Rb^+ absorption by *Chlorella* in light (○) and dark (●).

なかったが、明条件でのルビジウム吸収は DCMU の濃度が $1.0 \mu\text{M}$ 以上で顕著に抑制された。

明暗両条件でのクロレラの酸素発生ならびに酸素吸収に対する DCMU 添加濃度の影響について検討した結果を図-4 に示す。暗条件では、クロレラ懸濁液の溶存酸素濃度は時間の経過とともに低下するが、DCMU 濃度によって全く影響されなかった（一部、データ省略）。DCMU 無添加の場合、クロレラ懸濁液を光照射すると溶存酸素濃度の急激な上昇がみられた。添加した DCMU 濃度が $0.1 \mu\text{M}$ では溶存酸素濃度にほとんど影響しないが、 $0.3 \mu\text{M}$ では溶存酸素濃度は僅かに低下し、DCMU 濃度が $1.0 \mu\text{M}$ 以上で酸素発生は完全に抑制された。

(2) NaCN

明暗両条件でのルビジウム吸収に対する NaCN 添加濃度の影響について検討した結果を図-5 に示す。暗条件でのルビジウム吸収は NaCN の濃度上昇によって僅かしか影響されなかったが、明条件でのルビジウム吸収は NaCN の濃度上昇とともに明らかに低下した。

明暗両条件でのクロレラの酸素発生ならびに酸素吸収に対する NaCN 添加濃度の影響について検討した結果を図-6 に示す。暗条件では、クロレラ懸濁液の溶存酸素濃度は時間の経過とともに低下した。また、添加した NaCN 濃度の上昇によって溶存酸素濃度は若干低下した（一部、データ省略）。明処理条件下では、クロレラ懸濁液の溶存酸素濃度は上昇した。NaCN 濃度が 0.01 と 0.1 mM の場合、溶存酸素濃度の上昇の程度は若干低下し、NaCN 濃度が 1.0 mM 以上では顕著に低下した。

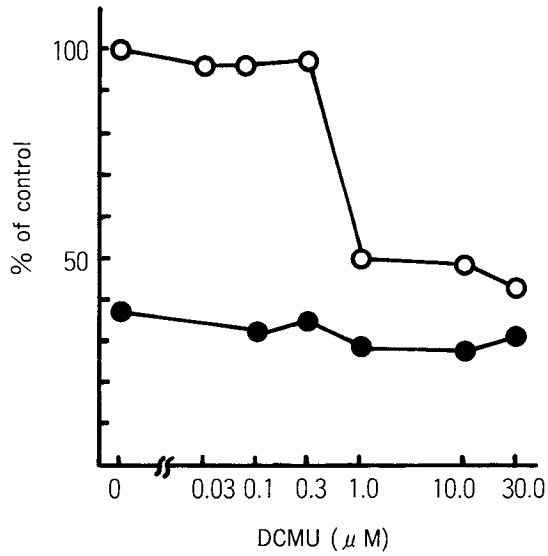


Fig. 3 Effect of DCMU on Rb⁺ absorption by *Chlorella* in light (○) and dark (●).

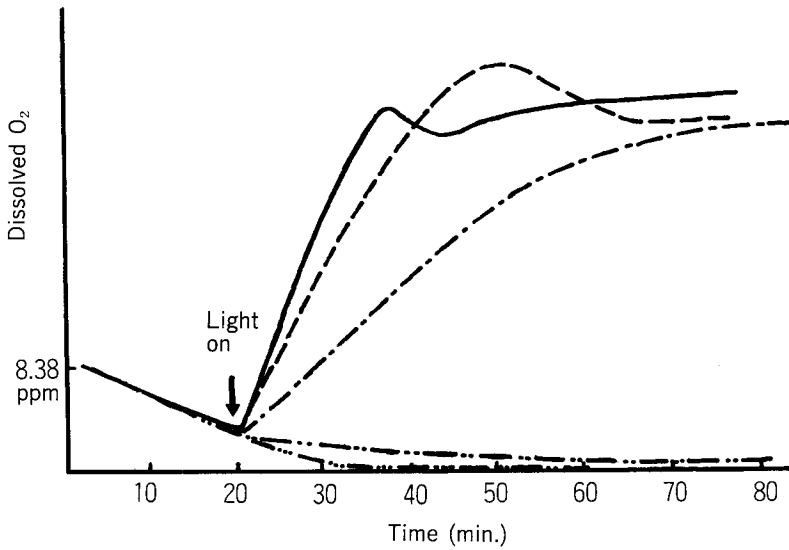


Fig. 4. Effect of DCMU on O₂ evolution of *Chlorella* in light.
 — DCMU 0 μM, ——— DCMU 0.1 μM, — — — DCMU 0.3 μM,
 - - - DCMU 1.0 μM, ····· DCMU 10.0 μM.

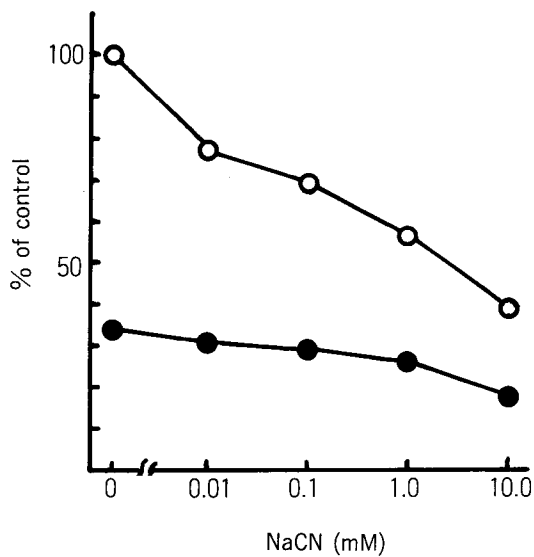


Fig. 5. Effect of NaCN on Rb^+ absorption by *Chlorella* in light (○) and dark (●).

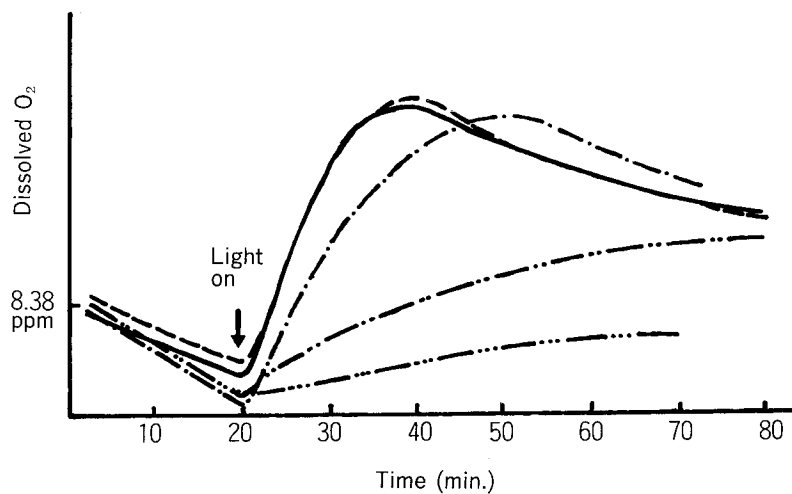


Fig. 6. Effect of NaCN on O_2 evolution of *Chlorella* in light.

————— NaCN 0 mM, ———— NaCN 0.1 mM, ———— NaCN 0.1 mM,
 ———— NaCN 1.0 mM, ———— NaCN 10.0 mM.

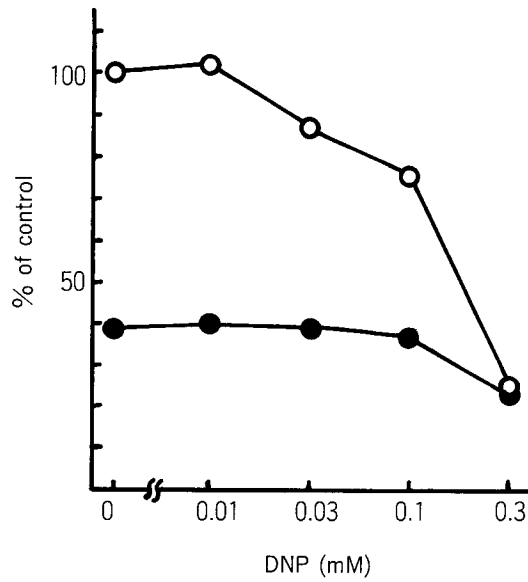


Fig. 7. Effect of DNP on Rb⁺ absorption by *Chlorella* in light (○) and dark (●).

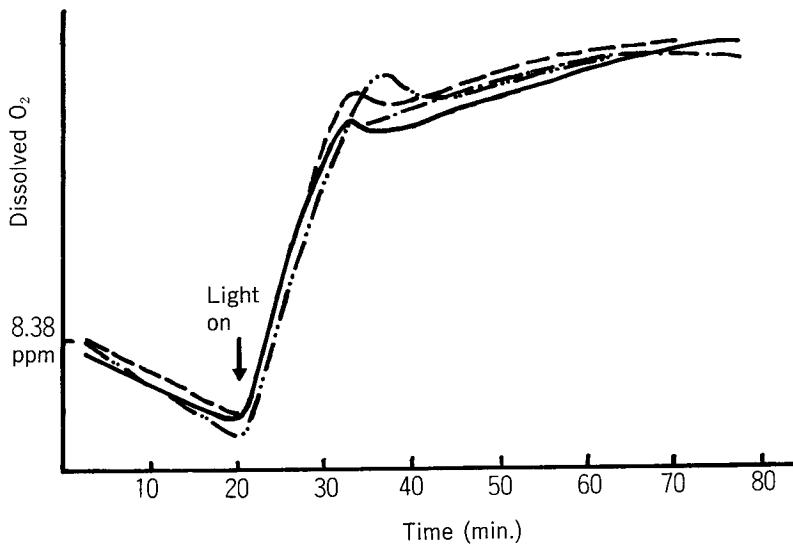


Fig. 8. Effect of DNP on O₂ evolution by *Chlorella* in light.

———— DNP 0 mM, ———— DNP 0.03 mM,
 ——— DNP 0.3 mM, ——— DNP 0.3 mM.

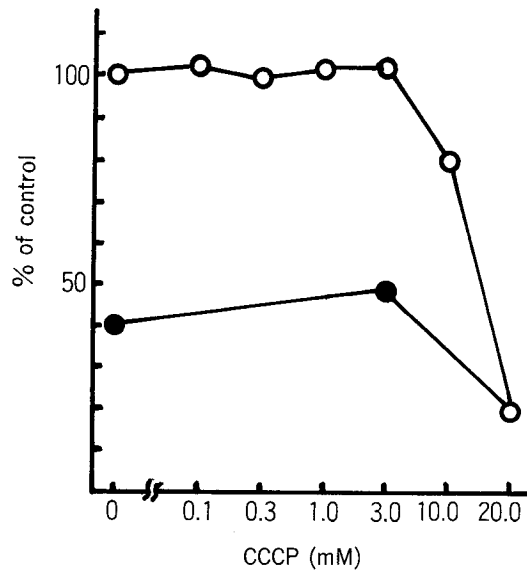


Fig. 9. Effect of CCCP on Rb^+ absorption by *Chlorella* in light (○) and dark (●).

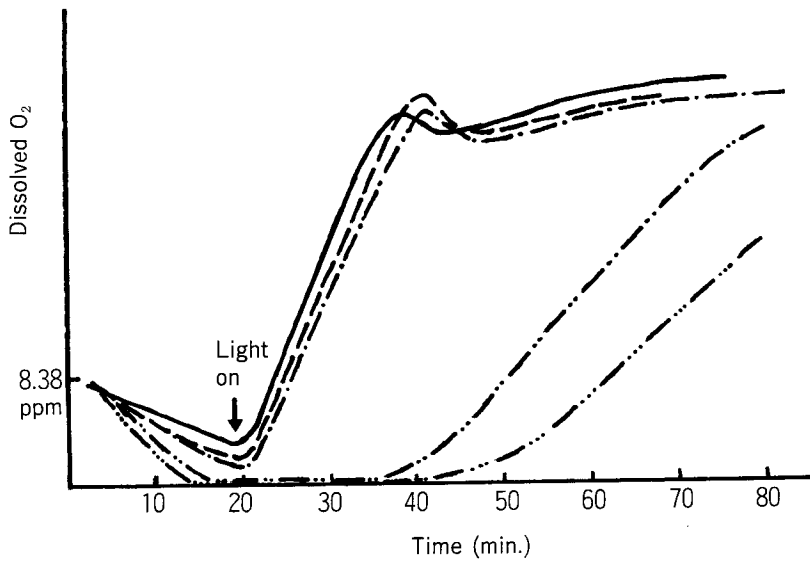


Fig. 10. Effect of CCCP on O_2 evolution of *Chlorella* in light.
 — CCCP 0 mM, ——— CCCP 0.1 mM, ——— CCCP 3.0 mM,
 - - - CCCP 10.0 mM, ····· CCCP 20.0 mM.

(3) DNP

明暗両条件でのルビジウム吸収に対する DNP 添加濃度の影響について検討した結果を図一 7 に示す。暗条件でのルビジウム吸収は DNP の濃度上昇によって僅かに低下した。明条件では、0.03 mM 以上の DNP の濃度上昇とともにルビジウム吸収は顕著に低下した。

明暗両条件でのクロレラの酸素発生ならびに酸素吸収に対する DNP 添加濃度の影響について検討した結果を図一 8 に示す。暗条件では、クロレラ懸濁液の溶存酸素濃度は時間の経過とともに低下するが、DNP 濃度の影響はほとんど認められなかった（一部、データ省略）。明処理条件下では、クロレラ懸濁液の溶存酸素濃度は上昇するが、DNP 濃度の影響は全く認められなかった。

(4) CCCP

明暗両条件でのルビジウム吸収に対する CCCP 添加濃度の影響について検討した結果を図一 9 に示す。暗条件でのルビジウム吸収は 3.0 μ M までの CCCP によっては影響を受けず、20 μ M 添加によって顕著に低下した。明条件では、3.0 μ M までの CCCP はルビジウム吸収にほとんど影響を与えず、10 μ M の CCCP 添加でルビジウム吸収は僅かに低下し、20 μ M 添加によって顕著に低下した。

明暗両条件でのクロレラの酸素発生ならびに酸素吸収に対する CCCP 添加濃度の影響について検討した結果を図一 10 に示す。暗条件では、クロレラ懸濁液の溶存酸素濃度は時間の経過とともに低下した。また、添加した CCCP 濃度の上昇とともに溶存酸素濃度は低下した（一部、データ省略）。明処理条件下では、クロレラ懸濁液の溶存酸素濃度は上昇するが、3.0 μ M までの CCCP 添加は溶存酸素濃度にほとんど影響を与えなかった。10 μ M 以上の CCCP 添加では溶存酸素濃度は顕著に低下したが、処理後約 40 分で溶存酸素濃度の上昇が認められた。

(5) Ouabain

明暗両条件でのルビジウム吸収に対する Ouabain 添加濃度の影響について検討した結果を図一 11 に示す。図一 11 から、明暗両条件の場合ともに、1.0 mM までの Ouabain の添加はルビジウム吸収に対してほとんど影響を与えなかった。

クロレラの酸素発生ならびに酸素吸収に対する Ouabain の影響に関する実験は省略した。

考 察

単細胞緑藻クロレラを用いて、そのルビジウム吸収に対する光照射の影響について検討した。その結果、クロレラのルビジウム吸収は光照射によって大きく促進された（図一 2）。この光促進現象は非常に短時間（10 分）でも認められた。

ルビジウム吸収に対する光促進効果の機作を追究するため、各種代謝阻害剤を用い、クロレラの光合成や呼吸とルビジウム吸収との関連について検討した。

DCMU の添加は暗条件下でのルビジウム吸収を僅かに抑制したにすぎないが、ルビジウム吸収の光促進に対しては 1.0 μ M 以上で顕著な抑制効果を示した。

暗条件でのクロレラ懸濁液の溶存酸素濃度の低下はクロレラの呼吸によると考えられるが、DCMU の添加はこのクロレラの呼吸にほとんど影響しなかった。一方、明条件でのクロレラ懸濁液の溶存酸素濃度の上昇はクロレラの光合成による酸素発生に起因すると考えられるが、

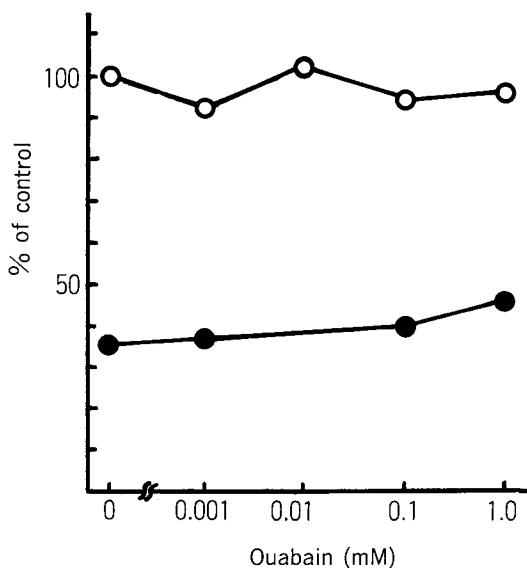


Fig. 11. Effect of ouabain on Rb^+ absorption by *Chlorella* in light (○) and dark (●).

1.0 μM 以上の DCMU の添加はこのクロレラの光合成速度を顕著に抑制した。

以上のように、DCMU の添加はクロレラにおけるルビジウム吸収の光促進と光合成速度の両方を抑制し、両者の間で比較的良好な阻害パターンが認められた。

NaCN の添加は明暗両条件でのルビジウム吸収を抑制したが、その濃度上昇による吸収抑制は暗条件よりも明条件の場合に明らかに大きかった。

暗条件でのクロレラ懸濁液の溶存酸素濃度は NaCN の濃度上昇とともに低下し、また、明条件でのクロレラの酸素発生も NaCN の濃度上昇とともに低下した。しかし、0.01 および 0.1 mM の NaCN による酸素発生に対する抑制効果は小さかった。これはルビジウム吸収の光促進効果の場合と相違した。

DNP の添加は暗条件でのルビジウム吸収にあまり大きな影響を与えず、0.3 mM で僅かに抑制効果を示した。ルビジウム吸収の光促進は添加した DNP の濃度上昇とともに顕著に抑制された。

他方、0.3 mM までの DNP の添加は明条件でのクロレラの酸素発生に全く影響を与えなかった。これはルビジウム吸収の光促進に対する場合とは完全に相違した。

CCCP の添加濃度が 3.0 μM 以下の場合には、明暗両条件でのルビジウム吸収にほとんど影響を与えなかった。しかし、10 μM 以上の添加で、明暗両条件の場合とも明らかな吸収抑制が認められた。

暗条件でのクロレラ懸濁液の溶存酸素濃度は CCCP の濃度上昇とともに低下した。明条件でのクロレラの酸素発生に対して、3.0 μM 以下の CCCP の添加は全く影響を与えなかった。10 μM 以上の CCCP 添加は明条件での酸素発生を完全に抑制したが、約 40 分の時間経過の後、溶存酸素濃度の明らかな上昇が認められた。ルビジウム吸収実験の時間が 2 時間であっ

たことから、この遅延した酸素発生は明条件でのルビジウム吸収実験の結果と一致するものとは考えられない。

Ouabain の添加は明暗両条件でのルビジウム吸収に対して全く影響を与えなかった。そのため、明暗両条件でのクロレラの酸素発生と酸素吸収に対する Ouabain の影響についての実験は行わなかった。

クロレラのルビジウム吸収に対する明暗両条件の差をクロレラの生育速度の相違によるとする考え方を本実験の結果から完全に否定することはかなり困難である。しかし、本実験に用いたクロレラ (*Chlorella ellipsoidea*) の 25°C での生育について、娘細胞が成長して 4 分割され、4 個の娘細胞になるのに約 22 時間を必要とすることが報告されている⁸⁾。本実験で、クロレラのルビジウム吸収に対する光促進効果が 10 分で明らかに認められたことを考えると、光によるルビジウム吸収の促進の原因を生育速度の差のみに帰することはできない。

明条件での植物葉組織によるカリウム吸収を DCMU は阻害しないことが報告されており¹²⁾、また、クロレラでも、そのイオン輸送と酸素発生に対する DCMU の阻害効果が必ずしも一致しないという報告^{3,5)}がある。しかし、本実験の結果から、用いた各種代謝阻害剤の中で、DCMU の添加がクロレラにおけるルビジウム吸収の光促進と光照射による酸素発生の両者に対してよく一致した影響を与えることが明らかとなった。DCMU による酸素発生の抑制が光化学反応系 II の電子伝達の阻害に起因するとされ^{6,7)}、また DCMU が non-cyclic photophosphorylation を阻害することも知られている⁶⁾が、ルビジウム吸収に対する光促進効果が光合成のどの過程に関連するかを本実験の結果から詳細に推論することはできない。しかし、本報告はこの光促進効果が光合成過程と密接に関連することを示唆するものであり、さらに今後の研究が望まれる。

摘 要

クロレラのルビジウム吸収に対する光照射の影響について検討した。その結果、光照射によってルビジウム吸収が明らかに促進されることが認められた。

各種代謝阻害剤による実験の結果から、明条件でのクロレラによるルビジウム吸収と酸素発生の両者に対して、DCMU の添加が最もよく一致した影響を示し、ルビジウム吸収の光促進効果と光合成過程との密接な関連が示唆された。

キーワード：クロレラ、光促進、代謝阻害剤、酸素発生、ルビジウム吸収

引 用 文 献

1. Barber, J. 1968. Measurement of the membrane potential and evidence for active transport of ions in *Chlorella pyrenoidosa*. Biochim. Biophys. Acta 150 : 618-625.
2. Barber, J. 1968. The influx of potassium into *Chlorella pyrenoidosa*. Biochim. Biophys. Acta 163 : 141-149.
3. Barber, J. 1968. Light induced uptake of potassium and chloride by *Chlorella pyrenoidosa*. Nature

217: 876-878.

4. Barber, J. 1969. Light-induced net uptake of sodium and chloride by *Chlorella pyrenoidosa*. Arch. Biochem. Biophys. 130: 380-392.
5. Barber, J. and Shieh, Y. J. 1973. Effects of light on net Na⁺ and K⁺ transport in Chlorella and evidence for *in vivo* cyclic phosphorylation. Plant Sci. Letters 1: 405-411.
6. 藤茂 宏. 1982. 光合成. p.32および125. 東京大学出版会, 東京.
7. 加藤 栄. 1973. 光合成入門. p.16-19. 共立出版, 東京.
8. Murakami, S., Morimura, Y. and Takamiya, A. 1963. Electron microscopic studies along cellular life cycle of *Chlorella ellipsoidea*. In "Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria (Dr. H. Takamiya Memorial Issue of Plant and Cell Physiology, Tokyo)", 65-83. The University of Tokyo Press, Tokyo.
9. Nobel, P. S. and Packer, L. 1964. Energy dependent ion uptake in spinach chloroplast. Biochim. Biophys. Acta 88: 453-455.
10. Nobel, P. S. and Packer, L. 1965. Light-dependent ion translocation in spinach chloroplast. Plant Physiol. 40: 633-640.
11. Rains, D. W. 1967. Light-enhanced potassium absorption by corn leaf tissue. Science 156: 1382-1383.
12. Rains, D. W. 1968. Kinetics and energetics of light-enhanced potassium absorption by corn leaf tissue. Plant Physiol. 43: 394-400.